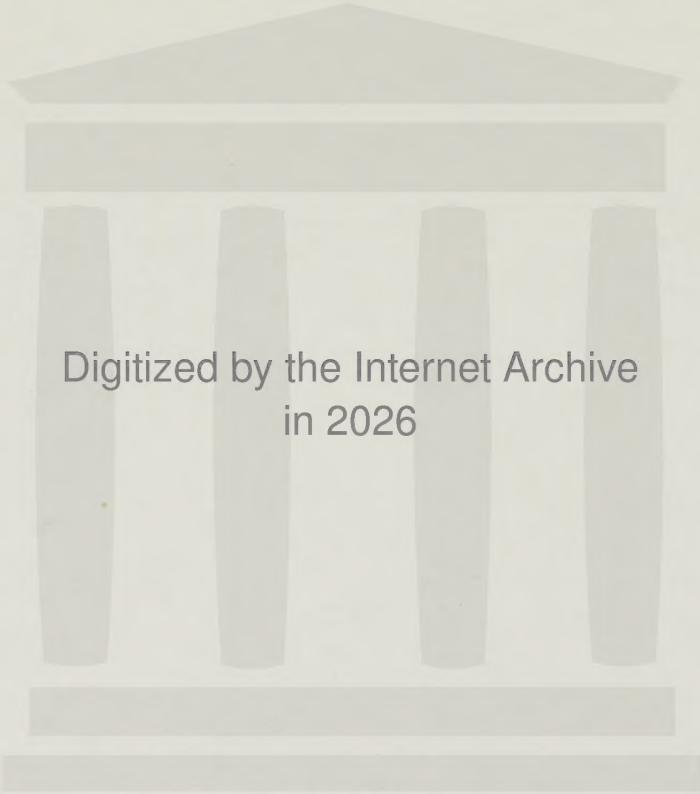


Versuche zur Eliminierung der Toxizität
für Zellkulturen von Reaktionsgemischen
aus Virus und Desinfektionswirkstoffen

Michael Roesger

Diss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. H. M a h n e l

Versuche zur Eliminierung der Toxizität für
Zellkulturen von Reaktionsgemischen aus Virus
und Desinfektionswirkstoffen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
Tierärztliche Fakultät
der Ludwig Maximilian Universität München

von
Michael Roesger
aus
Immendingen

München

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. H. Mahnel
Korreferent: Prof. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

Meinen lieben Eltern gewidmet

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Schrifttum</u>	3
2.1. Allgemeines	3
2.2. Toxizität viruzider Wirkstoffe für Zellkulturen	6
2.3. Toxizität von Neutralisiermitteln für Zellkulturen	9
2.4. Verfahren zur Eliminierung der Cytotoxizität viruzider Wirkstoffe und Neutralisiermittel aus Reaktionsgemischen	10
<u>3. Eigene Untersuchungen</u>	13
3.1. Material und Methoden	13
3.1.1. Desinfektionsmittel	13
3.1.2. Mittel zur Aufhebung der viruziden Wirkung (Neutralisiermittel, Enthemmer)	14
3.1.3. Virusarten und Nachweis	14
3.1.4. Zellkulturen und Medien	15
3.1.5. Prüfung der Toxizität der Desinfektions- und Neutralisiermittel	15
3.2. Ergebnisse	17
3.2.1. Toxizität desinfizierender Wirkstoffe für Kulturzellen	17
3.2.2. Toxizität der Neutralisiermittel für Kulturzellen	24

3.2.3.	Versuche zur Reduzierung der Cytotoxizität von Desinfektionswirkstoffen mit chemischen Neutralisiermitteln	34
3.2.4.	Versuche zur Enttoxifizierung von Reaktionsgemischen aus Virussuspension und Desinfektionsmitteln durch Gelzentrifugation	37
3.2.4.1.	Gel-Zentrifugiersystem mit Sephadex LH 20	37
3.2.4.2.	Gelzentrifugation von Virus	39
3.2.4.3.	Reduzierung der Cytotoxizität	41
4.2.4.4.	Eignung für den Restvirusnachweis	43
4.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	46
5.	<u>Zusammenfassung</u>	51
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	53

1. Einleitung

Infektionstüchtige Viren von Mensch und Tieren lassen sich, besonders bei geringer Zahl, nur über die Züchtung in Systemen lebender, empfänglicher Zellen nachweisen. Im Labor sind dies heute fast nur noch in vitro züchtbare Zellen, die Zell- oder Gewebekulturen. Sie haben in der Virologie die Versuchstiere praktisch entbehrlich gemacht. Kulturen lebender Zellen sind aber sehr empfindlich gegen unphysiologische Einflüsse jeder Art. Für die Prüfung pharmazeutischer und kosmetischer Präparate wird in neuerer Zeit zu recht gefordert, den Tierversuch so weit als möglich durch Tests an Zellkulturen zu ersetzen. Daten über die Toxizität für Zellkulturen, selbst von weit verbreiteten viel gebrauchten Chemikalien, fehlen jedoch bisher oder sind nicht greifbar.

Bei der Prüfung chemischer Desinfektionsmittel auf viruzide Wirksamkeit wird der Untersucher mit diesem Problem konfrontiert. Virussuspensionen wird die zu prüfende Chemikalie zugesetzt, die Reaktionsgemische müssen anschließend untersucht werden, ob und in welchem Umfang Virus inaktiviert wurde. Proben der Reaktionsgemische verimpft man deshalb auf Zellkulturen, um nicht inaktivierte Restviren nachweisen zu können. Durch den chemischen Wirkstoff im Reaktionsgemisch werden jedoch die Kulturzellen toxisch zerstört oder verändert. Der Restvirusnachweis ist dann nicht oder nur nach stärkerer Verdünnung des Reaktionsgemisches - und damit auch des nachzuweisenden Virus - möglich.

Zwar gibt es durchaus Methoden, in solchen Reaktionsgemischen den viruziden Wirkungsstoff vor dem Restvirusnachweis zu neutralisieren und anschließend die Chemikalie und das Neutralisierungsmittel aus der Probe zu entfernen. Eine solche "Reinigung" einer Virussuspension erfordert

jedoch nicht nur einen für Routineteste zu hohen Arbeitsaufwand, sondern sie ist fast immer mit Virusverlusten verbunden. Die Zuverlässigkeit des Virusnachweises wird dann vor allem beim Überleben nur weniger Restviren in Frage gestellt.

In der Bakteriologie tritt dieses Problem kaum in Erscheinung. Man verwendet im Rahmen von Bakterizieprüfungen Inaktivierungsmittel, sog. Enthemmer. Das sind Substanzen, welche die Bakterizidie des chemischen Wirkstoffs neutralisieren, seine Wirkung sofort nach dem Zusatz zum Reaktionsgemisch beenden. Anschließend kann das Gemisch aus Bakterien, desinfizierendem Wirkstoff und Enthemmer auf tote Nährböden verimpft werden, wodurch in der Regel die Vermehrung und damit der Nachweis von noch aktiven Restkeimen nicht beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufgabe gestellt, die Toxizität einiger wesentlicher viruzider Wirkstoffe für Zellkulturen und die toxischen Grenzkonzentrationen darzulegen. Ferner war zu untersuchen, ob sich die Cytotoxizität mit Neutralisierungsmitteln bzw. Enthemmern, soweit sie nicht selbst zelltoxisch wirken, zumindest reduzieren läßt. Schließlich sollte noch ein physikalisches Verfahren, die Gelzentrifugation, auf seine Eignung zur Eliminierung der Toxizität aus Virus-Wirkstoff-Reaktionsgemischen, ohne Beeinträchtigung der Viren, geprüft werden.

2. Schrifttum

2.1. Allgemeines

Für die Desinfektion von Viren werden zum Großteil die gleichen Wirkstoffe eingesetzt, wie sie seit Jahrzehnten für die Desinfektion der Bakterien und Pilze gebräuchlich sind und sich bewährt haben (HORN PRIVORA, WEUFFEN, 1972; WALLHAUßER, 1978). Viren sind zwar grundverschieden, viel einfacher als Bakterien aufgebaut und bestehen nur aus einer Nukleinsäure als Genom, einer Proteinkapsel und bei einem Teil der Virusarten zusätzlich einer äußeren aus Lipiden gebildeten Hülle, in die Proteine eingebaut sind (MAHNEL, 1983). Diese chemischen Bestandteile aber bilden bei Viren wie Bakterien die wesentlichen Angriffspunkte für die verschiedenen Arten von chemischen wie auch physikalischen Mitteln der Desinfektion (EGGENSBERGER, 1973; MAHNEL, 1983).

Bei Bakterien greifen die Desinfektionswirkstoffe in erster Linie an der Zellwand an. Dieselbe Wirkung wird natürlich auch auf andere Organismen mit Zellstruktur, unter anderem in in vitro-Kulturen lebender Zellen, die für die Vermehrung und den Nachweis von Viren notwendigen Zellkulturen, ausgeübt. Ein zellschädigender, cytotoxischer Effekt ist die Folge, der ab einer bestimmten Stärke der toxischen Noxe die Zelle zerstört (Richtlinien der Deutschen Vet. Med. Gesellschaft [R-DVG], 1977; Richtlinien der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten [R-DVV], 1982).

In Untersuchungen über die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf Mikroorganismen werden Bakterien, Pilze oder Viren mit dem Präparat oder Verdünnungen davon gemischt. Nach Ablauf der notwendigen Einwirkungszeit muß vor einer Prüfung der Reaktionsgemische, ob bzw. inwieweit die enthaltenen Mikroorganismen inaktiviert wurden, die bakterizide oder viruzide Wirkung des enthaltenen Wirkstoffes gestoppt, neutralisiert werden. Dies erreicht man mit speziellen, je nach

Desinfektionswirkstoff verschiedenen sogenannten Neutralisier- oder Inaktivierungsmitteln (REYBROUCK, 1978; REYBROUCK, 1979; R-DGHM, 1972; R-DVG, 1977). Sie werden auch Enthemmer genannt, weil Reste chemischer Desinfektionsmittel beim späteren Nachweis nicht erfaßter Keime deren Vermehrung ansonsten hemmen würden. Chemische Neutralisierungsmittel können jedoch ihrerseits ebenfalls bakterizid oder viruzid wirken. Dies muß in entsprechenden Vorprüfungen festgestellt bzw. ausgeschlossen werden (REYBROUCK, 1978; R-DGHM, 1972; R-DVG, 1972). Ferner hat man in Betracht zu ziehen, daß die Neutralisierungsmittel als Chemikalien eine toxische Wirkung auf Zellkulturen entfalten, wenn sie zum Beispiel mit Proben von Reaktionsgemischen aus Virus und Desinfektionsmitteln nach dessen Neutralisierung beim Restvirusnachweis auf Zellkulturen verimpft werden.

Eine viel geübte, meist bei Viruzidieprüfungen angewandte Methode, die Einwirkung eines Desinfektionsmittels auf Mikroorganismen rasch zu beenden, ist das "Ausverdünnen". Die Probe eines Reaktionsgemisches wird dazu nach Ablauf der Reaktionszeit 1:10 oder 1:100 verdünnt. Mit diesem Schritt werden jedoch nicht nur der im Gemisch enthaltene Wirkstoff, sondern auch evt. noch nicht inaktivierte Restkeime verdünnt, ihre Nachweisgrenze erniedrigt (LIESS und SCHURIAN, 1973; MAHNEL, 1974; R-DVG, 1977). Mit dem Verdünnen um 2 Zehnerpotenzen wird meistens auch die Cytotoxizität für Zellkulturen beseitigt.

Schließlich läßt sich aus Reaktionsgemischen von Mikroorganismen und Desinfektionsmittel sowie evt. zusätzlich Neutralisiermittel die mikrobizide Wirkung wie auch eine Cytotoxizität durch Dialyse- oder Säulenchromatografie-Methoden eliminieren (MATHEKA und WITTMANN, 1961; ZUFFA und NEURATH, 1961). Auch bei diesen beiden Verfahren aber müssen Nachteile in Kauf genommen werden. Die Desinfektionswirkung wird hier nur allmählich beendet, die Probe für den Nachweis von Restkeimen mehr oder weniger verdünnt.

Für die Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Viruzidie wurden von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft und von der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten in Verbindung mit dem Bundesgesundheitsamt Richtlinien erstellt, in welcher die Methodik der Prüfung von Mitteln an Viren in Suspension (Suspensionsversuch) festgelegt ist. Zunächst ist jeweils für das zu prüfende Desinfektionsmittel die Grenze seiner Toxizität für die zum Restvirusnachweis verwendeten Zellkulturen zu ermitteln. Bei der eigentlichen Prüfung der viruziden Wirkung im Suspensionsversuch sind die Reaktionsgemische nach Ablauf der Einwirkungszeit, wie oben dargestellt, auf die Verdünnungsstufe 10^{-2} zu verdünnen und erst ab dieser Stufe der quantitative Restvirusnachweis durch Verimpfung auf permissive Zellkulturen zu führen. Auf diesem Wege wird sowohl dem momentanen "Ausverdünnen" der viruziden Wirkung ohne Verwendung eines chemischen Neutralisiermittels als auch der Umgehung cytotoxischer Wirkungen, die nach Verimpfung unverdünnter oder leicht verdünnter Reaktionsgemische auf Zellkulturen zu erwarten sind, Rechnung getragen.

2.2. Toxizität viruzider Wirkstoffe für Zellkulturen

Dem Problem der Toxizität von chemischen Desinfektionsmitteln für lebende Zellen wird erst mit zunehmenden Umweltbewußtsein mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Veröffentlichungen, die sich direkt mit dieser Frage befassen, liegen nicht vor.

Daß für Desinfektionszwecke geeignete chemische Mittel Systeme lebender Zellen schädigen, liegt in ihrer Natur und ist bekannt seit Desinfektionsmittelprüfungen durchgeführt werden. Vor allem in Berichten über Viruzidieprüfungen, bei denen die Ergebnisse an Systemen lebender Zellen, wie Hühnerembryo oder seit etwa 25 Jahren fast nur noch Zellkulturen, gewonnen werden, wird dieser störende Effekt immer wieder angesprochen. BINGEL und HERMANN weisen 1966 auf das Problem der Toxizität der von ihnen geprüften Desinfektionsmittel für das Virusnachweissystem, in ihrem Falle bebrütete Hühnereier, hin und diskutieren eine "Entgiftung" der Reaktionsgemische, KIRCHHOFF (1969) und WRIGHT (1974) erwähnen es ebenfalls und lösten es durch 10fache Verdünnung. Nach der Einführung der Zellkultur zum Virusnachweis hat DREES 1956 als einer der ersten auf die Cytotoxizität für Kulturzellen von Virus-Desinfektionsmitteln aufmerksam gemacht. Zur Vermeidung dieses Effektes hielt er schon damals das Verdünnen der Reaktionsgemische aus Virus und Desinfektionsmittel bis zur Grenze ihrer Toxizität vor deren Verimpfung auf Zellkulturen (oder andere Systeme) für unumgänglich. Dieses "Ausverdünnen" der Cytotoxizität von Reaktionsgemischen bei Suspensionstesten im Rahmen von Viruzidieprüfungen hat schließlich auch 1974 in den "Richtlinien" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG) "zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin" seinen Niederschlag gefunden. Die Erfahrungen hatten gezeigt, daß Desinfektionsmittel mit viruziden Eigenschaften in den üblichen (wirksamen

und rentablen) Anwendungskonzentrationen von etwa 1 bis 2 %ig für Kulturzellen in der Regel nicht mehr toxisch sind, wenn sie zuvor mit den Reaktionsgemischen auf 10^{-2} (1:100) verdünnt werden (MAHNEL, 1974). Gemäß der genannten Richtlinien wird deshalb bei der Vorprüfung (Suspensionsversuch) der Restvirusnachweis an Reaktionsgemischen erst ab der Verdünnungsstufe 10^{-2} durchgeführt. Daneben wird in der Vorprüfung auch die Feststellung der Toxizitätsgrenze des zu prüfenden Mittels für die verwendeten Virusnachweissysteme (Zellkulturen) verlangt. In gleicher Weise hat die Ausschaltung der Cytotoxizität durch Ausverdünnung auch 1982 in den "Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren" Eingang gefunden.

Verwertbare Daten über die Cytotoxizität von Desinfektionsmitteln bzw. deren viruziden Wirkstoffe wären aus den Gutachten über Desinfektionsmittelprüfungen der letzten Jahre der DVG, evt. der DVV, zu entnehmen. Sie sind jedoch nicht zugänglich und werden nicht veröffentlicht. Aufgrund seiner Erfahrungen aus Viruzidieprüfungen im Suspensionsversuch an Handelsdesinfektionsmitteln mit verschiedenen Hauptwirkstoffen bemerkt MAHNEL (1974), daß die Grenze der Toxizität solcher Mittel für bebrütete Hühnereier bei einer Verdünnung um 1:1000, für Zellkulturen überwiegend zwischen den Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} liegt.

Nur ungefähr lassen sich einzelne Anhaltswerte aus einigen publizierten Versuchen mit viruziden Wirkstoffen über deren Bereich der Cytotoxizität für Zellkulturen abschätzen. Bei Formalin dürften Konzentrationen im Zellkulturmedium bis 0,002 % (TANABE und HOTTA, 1976; SHEN und Mitarbeiter, 1977) bzw. sogar bis 0,005 % (MAHNEL und HERLYN, 1976) noch nicht für Kulturzellen toxisch sein, etwa dieselbe

Grenze errechnet sich für Chloramin-T (MAHNEL und HERLYN, 1976). Auch für Phenol (MAHNEL und HERLYN, 1976) und oberflächenaktive Verbindungen wie Quats (TANABE und HOTTA, 1976) kann mit einer Cytotoxizität ab Konzentrationen von etwa 0,002 % bis 0,01 % je nach Mediumart (Proteingehalt) und Zellart gerechnet werden. Eine etwas stärkere toxische Wirkung für Kulturzellen ist nach SPORKENBACH und Mitarbeitern (1981) bei Persäuren und persäuren Desinfektionsmitteln zu erwarten. Hier lag die Grenze bei Monolayer-Kulturen bereits bei maximal 0,01 bis allenfalls 0,002 %.

Die cytotoxischen Grenzen für die bekannt etwas weniger empfindlichen HEP2-Zellen (Zelllinie humaner Carcinomzellen) von drei Wirkstoffen haben BLACKWELL und CHEN (1970) mitgeteilt. Phenol wirkte bis zur Konzentration von 0,05 %, Äthanol ab 0,47 % und Jod ab 0,8 ppm im Kulturmedium toxisch.

2.3. Toxizität von Neutralisiermitteln für Zellkulturen

Neutralisiermittel, auch Inaktivierungsmittel oder Enthemmer genannt, sind Chemikalien, die man Reaktionsgemischen aus Keimen und Desinfektionsmitteln nach Ablauf der Reaktionszeit zusetzt, um die bakterizide bzw. viruzide Wirkung zu stoppen.

Werden Reaktionsgemische aus Virus und Desinfektionswirkstoff, die in oben genannter Absicht neutralisiert wurden, zwecks Restvirusnachweis auf Zellkulturen verimpft, dann spielt auch eine eventuelle Toxizität das dem Reaktionsgemisch zugesetzten Neutralisiermittels eine Rolle.

Untersuchungen über die Wirkung solcher Mittel auf Kulturzellen liegen nicht vor. Es wurde lediglich aus Bakterizidprüfungen empirisch erkannt, daß die Neutralisiermittel selbst in bestimmten Konzentrationen auf Bakterien, die Zellen besonders widerstandsfähiger Art sind, ebenfalls eine bakterizide Wirkung ausüben können.

Eine umfassende Untersuchung über solche Effekte bei gebräuchlichen Neutralisiermitteln führte REYBROUCK 1978 mit Hilfe quantitativen Suspensionsversuchen an *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* durch. Geprüft wurden einfache wie auch kombinierte (aus mehreren einfachen Substanzen zusammengesetzte) Neutralisiermittel. Einige dieser Mittel hemmten in gebräuchlichen Konzentrationen das Wachstum ungeschädigter Keime.

Ohne Zweifel lassen diese Befunde und empirischen Erkenntnisse die Schlußfolgerung zu, daß Neutralisiermittel, die widerstandsfähigen Bakterienzellen zu schädigen in der Lage sind, auf viel sensiblere in vitro-Kulturzellen eine mehr oder weniger schädigende toxische Wirkung ausüben dürften.

2.4. Verfahren zur Eliminierung der Cytotoxizität viruzider Wirkstoffe und Neutralisiermittel aus Reaktionsgemischen

Die bei Viruzidietesten bislang überwiegend geübte Methode, die Cytotoxizität für Zellkulturen von Reaktionsgemischen aus Virus und Desinfektionswirkstoff auszuschalten, ist das "Ausverdünnen" (vergl. 2.1.). Diese Methode hat jedoch den eminenten Nachteil, daß mit der Verdünnung eines virus-haltigen Reaktionsgemisches, in dem eine quantitative Virusinaktivierung abläuft, auch die Nachweisgrenze für nichtinaktiviertes Restvirus vielfach entscheidend herabgesetzt wird. Um beispielsweise nachzuweisen, daß alle im Gemisch enthaltenen Viren vom viruziden Wirkstoff erfaßt und inaktiviert wurden, müßte der Virusnachweis in Zellkulturen mit unverdünnten Proben geführt werden. Bei Suspensionsversuchen ist dies nicht möglich.

Einen Weg, aus Proben von Reaktionsgemischen ohne direkte Verdünnung cytotoxische Chemikalien von Viren zu trennen, bietet die Dialyse. ZUFFA und NEURATH (1961) haben auf diese Weise aus Suspensionen von Pseudowutvirus inaktivierendes cytotoxisch wirkendes Formalin abgetrennt. Dieses Verfahren hat jedoch infolge zu vieler Nachteile in der Praxis von Viruzidieprüfungen keine Nachahmung gefunden. Abgesehen vom zu hohen Zeitaufwand (Tage) sind dabei, besonders bei labileren Virusarten, Verluste in der Virusinfektiosität unvermeidbar, die viruzide Wirkung des Wirkstoffes wird nicht sofort, sondern nur allmählich beendet, und besonders bei Proben kleinen Volumens treten schwerwiegende technische Probleme auf (MATHEKA und WITTMANN, 1961).

Eine auch für eine Enttoxifizierung brauchbare Alternative zur Dialyse haben 1961 MATHEKA und WITTMANN mit der Entsalzung von Virussuspensionen durch Gel-Filtration aufgezeigt. Es wird dabei ein Dextran-Gel verwendet, das aus

untereinander vernetzten Polysaccharidketten besteht und einen stark hydrophilen Charakter besitzt. In Suspension hat dieses Gel die Eigenschaft, niedermolekulare Elemente wie Wasser, Desinfektionsmittel und Salze zurückzuhalten, großmolekulare Partikel wie Viren aber passieren zu lassen. Man kann von einem molekularen Siebeffekt sprechen (MATHEKA und WITTMANN, 1961). Die Autoren führten die Entsalzung bzw. Abtrennung der Viren an ruhenden mit Gel beschichteten Säulen durch. Die inzwischen vielfach auch in der Virologie verwendete Gelfiltration haben BLACKWELL und CHEN (1970) erstmals für die Enttoxifizierung von Virus-Desinfektionsmittelgemischen herangezogen. Sie entwickelten ein System der künstlich stark beschleunigten Gelfiltration durch Zentrifugation, abgestimmt auf eine rasche Abtrennung von desinfiziertem Virus aus Proben von Reaktionsgemischen. Ein Zentrifugenröhrchen, mit Gel (Sephadex LH 20) gefüllt, besitzt am Boden eine Öffnung und wird einem etwas größeren Zentrifugenröhrchen aufgesetzt. Nach Überschichtung des Gels mit der Virusprobe wird dieses System etwa 10 Minuten niedertourig zentrifugiert. Das Virus passiert in dieser Zeit das Gel und kann mit dem Filtrat am Boden des äußeren Röhrchens gewonnen, während Salze und Desinfektionsmittel im Gel zurückgehalten werden.

Die Autoren berichten, daß mit Hilfe dieser Präparation cytotoxische Effekte auf Kulturzellen weitgehend vermieden werden konnten, mußten jedoch geringe Virusverluste von weniger als einer Zehnerpotenz in Kauf nehmen. Die Eliminierung der Cytotoxizität gelang ihnen bei Phenol bis zu Konzentrationen in der Gel-zentrifugierten Probe von 5 %, bei Formaldehyd bis zu 8 %, bei Jod als Jodophor nur bis zu 0,8 ppm, bei Natriumhypochloritlösung mindestens bis zur Konzentration von 200 ppm und bei der quaternären Ammoniumverbindung Alkyl-Dimethyl-Benzyl-Ammoniumchlorid als Tinktur bis über 1000 ppm. Gegenüber unbehandelten Proben entsprach dies einer Reduktion der Cytototxzizität

um mindestens das 10fache (Jod) in der Regel aber um das 100 bis über 1000fache.

In einer späteren Studie bestätigten BLACKWELL und Mitarbeiter (1975) die Eignung ihrer oben genannten Methode der chemischen Detoxifikation von Virus-Desinfektionsmittel-Reaktionsgemischen mittels "Sephadex-Molekularsieb-Filtration" auch an Soda (5 %), Natronlauge (2 %), Jod (2 % in 95 % Äthanol), Essig- und Zitronensäure (2 %) und Mischungen dieser Wirkstoffe. Auch das kationische Chlorhexidin (NOLVASAN-Lösung), eine quaternäre Phosphoniumverbindung und sehr toxisch für Kulturzellen, ließ sich durch die Gelzentrifugation vom Virus trennen, was MATISHECK (1978) bestätigen konnte. SCOTT (1980) prüfte 35 der verschiedensten Handelsdesinfektionsmittel im Suspensionsversuch und mit teilweise gegenüber den Herstellerempfehlungen überhöhten Konzentrationen auf Viruzidie gegenüber 3 feline Virusarten und eliminierte die Cytotoxizität aus den Gemischen nach dem Zentrifugationsverfahren von BLACKWELL und CHEN erfolgreich. Schließlich hat auch BROWN (1981) dieses Verfahren in Viruzidieprüfungen mit 14 Desinfizientien aus den bekannten effektiven Wirkstoffgruppen zur Enttoxifizierung herangezogen, ohne über Mißversuche oder negative Erfahrungen zu berichten.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Desinfektionsmittel

In den Untersuchungen wurden folgende Chemikalien aus verschiedenen Wirkstoffgruppen mit viruziden Eigenschaften verwendet:

Jodophor: PVD-Jod 17/12, Schülke und Mayr GmbH Norderstedt
Polyvinylpyrrolidon-Jod
Es wird als mildes Hautdesinfektionsmittel eingesetzt.

Phenol: Merck Nr. 200; DAB 8
Phenol ist als kristalline Masse im Handel. Es ist ein starkes Protoplasmagift. Die tödliche Dosis liegt beim Menschen bei 15-30 g.

N-Cetylpyridiniumchlorid: Merck Nr. 2340
Die quaternäre Ammoniumverbindung ist als weißes Pulver erhältlich.

Chloramin T: Merck Nr. 2424; DAB 7
Chloramin T ist ein Präparat der Gruppe mit "gebundenem Chlor". In Gegenwart von Wasser wird 24 % - 36 % aktives Chlor abgespalten.

Formalin: Merck Nr. 4001; DAB 7
Sein Wirkstoff ist der Formaldehyd; er liegt mit 35 % gelöst vor.

3.1.2. Mittel zur Aufhebung der viruziden Wirkung

(Neutralisiermittel, Enthemmer)

Polysorbat 80 (Tween 80)	Serva Heidelberg Nr. 37475
Lubrol	Sigma Chemical Company
Lecithin	Merck Nr. 5331
Natriumthiosulfat	Merck Nr. 6512
Natriumthioglycolat	Merck Nr. 6691
Natriumsulfit	Merck Nr. 6657
Histidin	Merck Nr. 4357
L-Cystein	Merck Nr. 2838

Auf die einzelnen Kombinationen Desinfektionswirkstoff-Neutralisiermittel wird im Abschnitt 3.2.3. eingegangen.

3.1.3. Virusarten und Nachweis

Für die Versuche, in die Viren einbezogen waren, wurden ausgewählt als Vertreter der hüllenlosen Viren:

Poliomyelitis (Polio)-Virus des Menschen, Typ 1, attenuierter Impfstamm, Familie Picornaviridae, Genus Enterovirus, RNS-Typ, 25-30 nm.

Es wurde als Kulturvirus aus Vero (Affennieren)-Zellen eingesetzt und in diesen Kulturen anhand seines starken cytopathischen Effektes nachgewiesen;

als Vertreter der behüllten Viren:

Pseudowut (Aujeszky)-Virus, Stamm Hannover II, Familie Herpesviridae, DNS-Typ, ca. 150 nm. Es wurde als Kulturvirus der 3. Passage in Sekundärkulturen aus embryonalen Rinderlungen (BEL) eingesetzt und in Vero-Kulturen anhand seines ausgeprägten cytopathischen Effektes nachgewiesen.

Für die Titrierung der beiden Testviren dienten die vorgenannten Zellkultur-Nachweissysteme (Röhrchenkulturen). Zur Bestimmung der mittleren kulturinfektiösen Dosis (KID_{50}) wurden die zu untersuchenden Proben mit MEM in Zehnerpotenzen verdünnt und je 0,1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen auf jeweils 4 Reagenten des Nachweissystems verimpft. Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach der Methode von KÄRBER und SPEARMAN in 50 % kulturinfektiösen Dosen (KID_{50}) pro ml anhand der mikroskopisch abgelesenen cytopathischen Zellzerstörung (cpE).

3.1.4. Zellkulturen und Medien

In den gesamten Untersuchungen wie auch für den Virusnachweis wurde die Affennieren-Zelllinie "Vero" verwendet. Als Anzuchtmedium diente MEM (Eagles Minimal Essential Medium + Glutamin) mit den Zusätzen: 1,2 % $NaHCO_3$, 5 % FRS, (foetales Rinderserum), 100.000 IE Penicillin/l und 100 µg Streptomycin/l. Das Erhaltungsmedium hatte die gleiche Zusammensetzung, nur der Gehalt an FRS wurde auf 2,5 % reduziert. Die Anzüchtung der Zellen erfolgte in Roux-Flaschen und Teströhrchen.

3.1.5. Prüfung der Toxizität der Desinfektions- und Neutralisierermittel

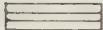
Die Prüfung auf Zelltoxizität (cytotoxischer Effekt, CTE) für Kulturzellen wurde einheitlich vergleichend an frisch angelegten, gerade zum geschlossenen Zellrasen ausgewachsenen Einschichtzellkulturen der Affennieren-Zelllinie VERO vorgenommen. Zelltoxische Effekte traten in der Regel sehr rasch innerhalb 24 Stunden ein, die Endablesung der Effekte wurde nach 2 Tagen durchgeführt.

Die zu prüfenden Chemikalien wurden 1:10 (10%ige Lösung) und 1:20 (5%ige Lösung) mit MEM-Medium ohne Zusätze vorverdünnt und davon ausgehend ansteigende Verdünnungsstufen in Zehnerpotenzen hergestellt. Von diesen Verdünnungsstufen wurden je 0,2 ml zu 1,8 ml Kulturmedium von je 2 Testkulturen (Röhrchenkulturen von VERO-Zellen) verimpft. Kontrollkulturen ohne Mediumzusatz dienten als Vergleich.

Die beimpften Kulturen wurden lichtmikroskopisch (Gesamtvergrößerung 40fach) im Nativzustand täglich durchgemustert und toxische Effekte vergleichend anhand des Gesamt- und Einzelzellbildes registriert.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Toxizität desinfizierender Wirkstoffe für Kultur- zellen

Als Modellsubstanzen mit viruzider Wirkung wurden die Präparate nach DAB Phenol und Formalin, ein Jodophor (PVD-Jod 17/12), Chloramin T sowie die quaternäre Ammoniumverbindung Cetylpyridiniumchlorid ausgewählt und ihre Cytotoxizität für Affennierenzellen der Vero-Linie untersucht. Die für die 5 Desinfizientien ermittelten Werte wurden in den graphischen Darstellungen 1 bis 5 schematisch aufgezeichnet. In den Abbildungen kennzeichnet die waagrechte  Schraffierung jeweils den Bereich eines vollständigen cytotoxischen Effektes, die senkrechte Musterung  die Übergangszone zu den nichttoxischen Konzentrationen mit partiellem bis schwachem CTE.

Phenol

Phenol wirkte bis zur Konzentration von 0,1 % im Kulturmedium absolut, ab 0,01 % nicht mehr toxisch. 24 Stunden nach Verimpfung von Phenolkonzentrationen über 0,1 % ließ sich ein CTE in Form einer Fixierung der Zellen an die Glaswand der Kulturröhrchen und allmählicher Ablösung beobachten. Unter 0,1 % trat der CTE nicht mehr großflächig auf, war aber gleichwohl deutlich vorhanden. Er verringerte sich nach und nach bis zu einer Konzentration von 0,05 %. Ab 0,01 % ließen die Zellen keine cytotoxische Veränderung mehr erkennen. Der pH-Wert des Kulturmediums sank von 8 (1 %) auf 6,6 (ab 0,1 %). Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

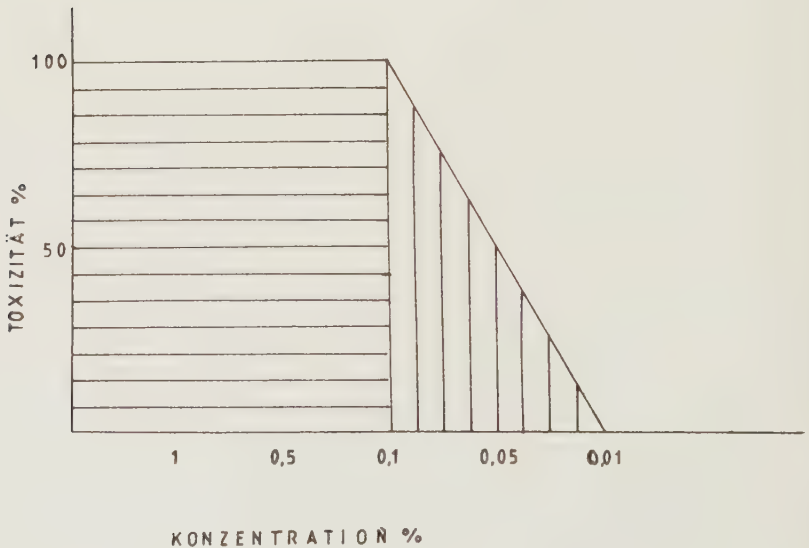


Abb. 1 Bereich der Zelltoxizität für Phenol

Formalin

Die cytotoxische Wirkung von Formalin wird in Abbildung 2 schematisch aufgezeigt. Bei den Kulturzellen, die Formalinkonzentrationen von 5 % bis 0,1 % ausgesetzt worden sind, ließ sich ein totaler CTE in Form einer Fixierung der Zellen an die Röhrchenwand beobachten. Bei Konzentrationen von 0,05 % und 0,01 % lösten sich die Zellen allmählich ab. Der pH-Wert des Zellmediums schlug mit ansteigendem Formalingehalt vom leicht sauren Bereich in den leichtalkalischen Bereich um ab der Konzentration von 0,005 % im Kulturmedium wirkte Formalin nicht mehr toxisch.

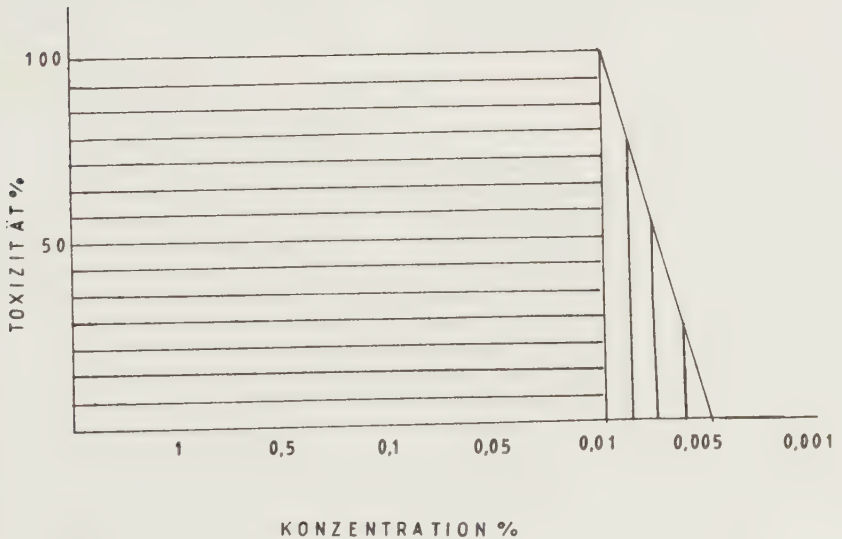


Abb. 2 Bereich der Zelltoxizität für Formalin

Jodophor

Jodophor (Polyvinylpyrrolidon-Jod) erwies sich für die Vero-Zellen bis zu einer Grenzkonzentration von 0,1 % als absolut toxisch (vergl. Abb. 3). Nach 24 Stunden zeigten die Kulturen mit Mediumkonzentrationen von 1 % und 0,5 % einen verbreiteten CTE. Bei 1 % dominierten eine partielle Cytolyse neben abgekugelten Zellen, bei 0,5 % blieb die Cytolyse zwar begrenzt, war dafür aber mit ca. 80 % abgekugelten Zellen gekennzeichnet. Der Anteil der abgekugelten Zellen und der der lysierten Zellen bei 0,1 % blieb gering. Eine 0,01 % Jodophorkonzentration rief an den Kulturzellen keinerlei Veränderung mehr hervor. Der pH-Wert des Mediums bei der 1 % Konzentration war leicht sauer bis neutral (6,7 - 7). Bei den übrigen Konzentrationen bewegte sich der pH Wert des Kulturmediums zwischen 7.0 und 7.2.

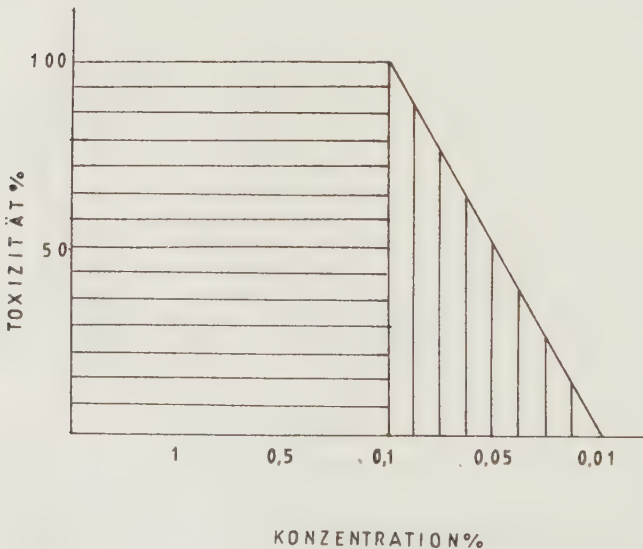


Abb. 3 Bereich der Zelltoxizität für Jodophor

Chloramin T

Chloramin T war bis zu einer Konzentration von einschließlich 0,05 % absolut toxisch für die Kulturzellen. Bei der 1 % Chloraminkonzentration trat eine großflächige Ablösung der Zellen auf. Senkte man den Gehalt an Chloramin T im Medium auf 0,5 % konnte man zum Teil eine Ablösung der Vero-Zellen beobachten, zum anderen eine gleichzeitige Fixierung an die Röhrchenwand. Das gleiche Bild, Ablösung und Fixierung, zeigte sich auch bei den nachfolgenden Konzentrationen von 0,1 % und 0,05 %. Erst als Chloramin T 0,01 % im Medium vorlag, blieben die Zellen ohne Veränderungen.

Der pH-Wert des Mediums zeigte leicht alkalische Werte (7,2 - 7,4) bei den Konzentrationen von 1 % bis 0,05 %, wechselte bei den restlichen Werten (s. Abb. 4) in den leicht sauren Bereich.

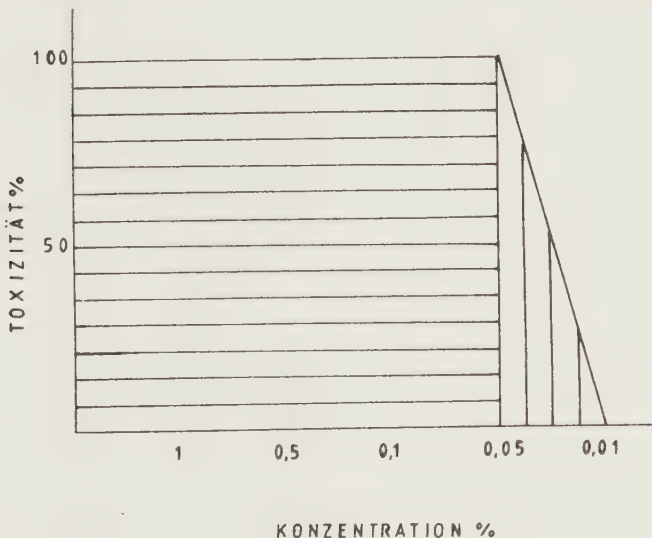


Abb. 4 Bereich der Zelltoxizität für Chloramin T

Cetylpyridiniumchlorid

Cetylpyridiniumchlorid erwies sich als äußerst toxisch für die Kulturzellen. Die absolut toxische Grenze reichte bis zu einer Konzentration von 0,0005 %. Eine Konzentration von 1 % hatte eine großflächige Ablösung der Zellen zur Folge. Den folgenden Konzentrationsbereich, beginnend bei 0,5 % bis einschließlich 0,005 %, kennzeichnete eine Fixierung der Zellen an der Röhrchenwand. Ein 0,001 % Gehalt an Cetylpyridinium bewirkte eine Ablösung von ca. 2/3 der Kulturzellen. Erst von 0,0001 % an blieben Veränderungen, bedingt durch eine zu hohe Cetylpyridiniumkonzentration, aus (vergl. Abb. 5).

Der pH-Wert des Kulturmediums ging vom anfangs alkalischen Bereich (7-8) allmählich zum neutralen Bereich zurück (0,0005 %), und schlug bei 0,0001 % in den leicht sauren Bereich um (6,8).

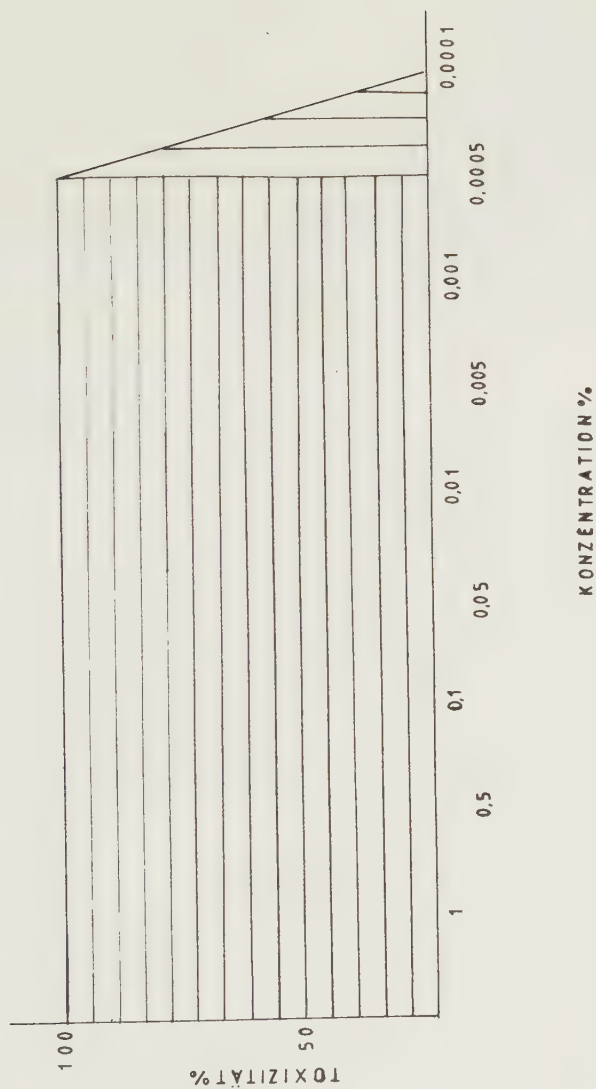


Abb. 5 Bereich der Zelltoxizität für Cetylpyridiniumchlorid

3.2.2. Toxizität der Neutralisiermittel für Kulturzellen

Neutralisiermittel neutralisieren und beenden die desinfizierende, nur sehr begrenzt aber andere Wirkungen von Desinfektionswirkstoffen. Da sie selbst und direkt auf Zellen toxisch wirken können, war auch für sie wie bei den Desinfektionswirkstoffen die Cytotoxizität zu ermitteln, bevor Versuche über die Neutralisierbarkeit der zelltoxischen Wirkung von Desinfektionswirkstoffen begonnen wurden. Versuchsaufbau und Ablauf sowie die Bedeutung der Schraffierungen in den graphischen Abbildungen sind mit den bei der Desinfektionswirkstoffprüfung verwendeten Verfahren und Symbolen identisch.

Tween 80

Der Bereich, in dem Tween absolut toxisch auf Kulturzellen wirkte, umfaßte die Konzentrationen 1 % und 0,5 % (Abb. 6). In beiden Bereichen lösten sich die Zellen von ihrer Glasunterlage ab. Bei 0,1 % blieben die Zellen an der Röhrenwand haften, gleichwohl mit vereinzelt kleinflächigem CTE. Der nichttoxische Bereich begann bei 0,05 %, wobei die Zellen gestreckt und nur vereinzelt rundliche Formen zu erkennen waren. Der pH-Wert des Kulturmediums schwankte bei allen Konzentrationen zwischen leicht sauer und neutral (6,8 - 7).

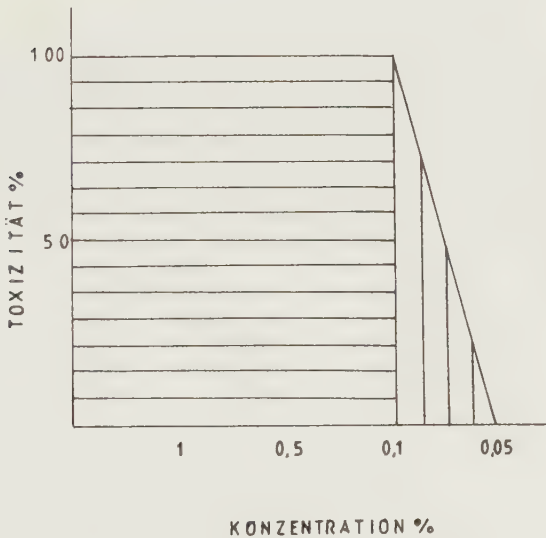


Abb. 6 Bereich der Zelltoxizität für Tween 80

Lubrol

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, handelte es sich bei Lubrol um eine äußerst toxische Substanz, deren absoluter cytotoxischer Bereich bis zu einer Verdünnung von einschließlich 0,005 % reicht. Bis zu dieser Grenze waren in allen vorangegangenen Konzentrationen die Zellen in toto abgelöst. Erst ab 0,001 % blieben die Zellen an der Röhrchenwand. Der pH Wert des Mediums betrug im absolut toxischen Bereich 7,4, im nichttoxischen 6,8 - 7. Lubrol mußte, um in Lösung gebracht zu werden im Wasserbad bei 56°C erwärmt werden.

Lecithin

Lecithin war bis zu einer Konzentration von 0,005 % cytotoxisch. Ein Lecithingehalt im Medium von 1 %, 0,5% und 0,1 % bewirkte eine Ablösung der Zellen. Von 0,05 % bis 0,005 % blieben die Kulturzellen an der Röhrchenwand haften, jedoch mit deutlichem CTE, der allmählich immer geringer wurde. Ab 0,001 % trat dieser CTE nicht mehr auf.

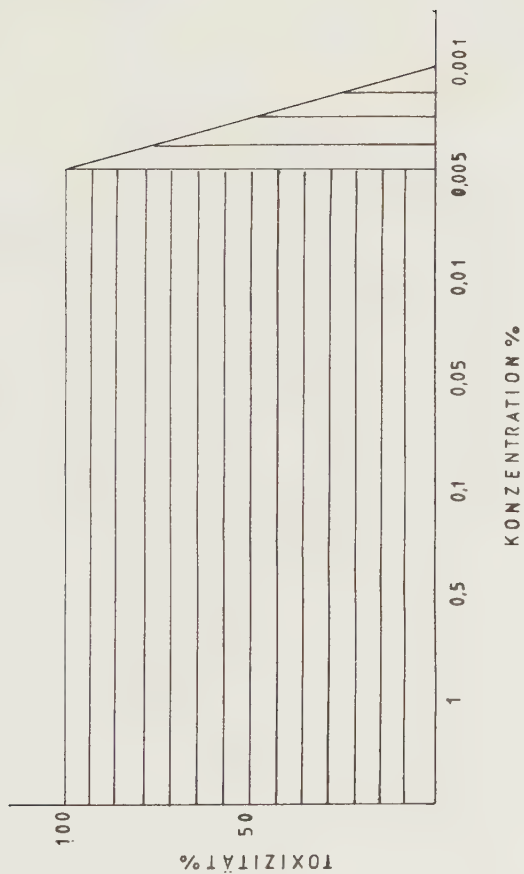


Abb. 7 Bereich der Zelltoxizität für Lubrol

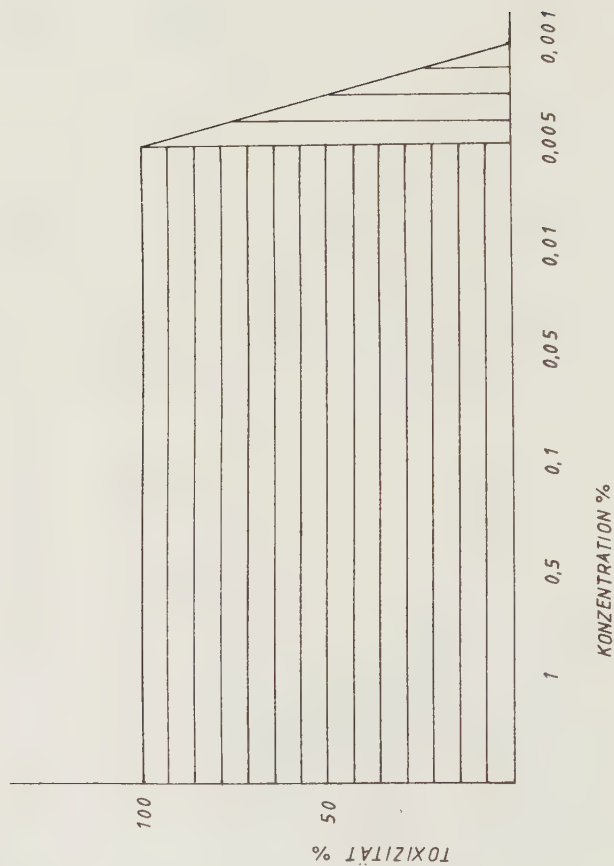


Abb. 8 Bereich der Zelltoxizität für Lecithin

L-Cystein

Abbildung 9 zeigt, daß die absolut toxische Grenze von L-Cystein bis einschließlich 0,1 % reicht. Die 1 % Konzentration von L-Cystein im Medium hatte eine totale Ablösung der Zellen zur Folge. Bei 0,5 % blieben die Vero-Zellen zwar an der Röhrchenwand, nahmen aber eine kugelige Gestalt an. Erst von 0,05 % an blieben die Zellen ohne jede Veränderung.

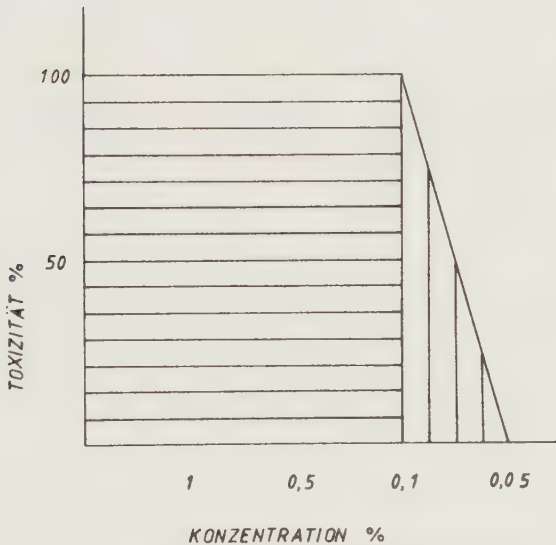


Abb. 9 Bereich der Zelltoxizität für L-Cystein

Natriumthiosulfat

Die Natriumthiosulfatkonzentrationen von 1 % und 0,5 % verursachten bei den Kulturzellen eine Cytolyse, die bei 1 % mittelgradig ausfiel um bei 0,5 % in eine vereinzelte, kleinflächige Cytolyse überzugehen. Die Zellen besaßen eine rundliche Gestalt. Die 0,1 % Konzentration rief keinen CTE mehr hervor. Der pH Wert des Mediums schwankte bei allen Konzentrationen um den Neutralpunkt herum (7,0 - 7,2). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 10 schematisch dargestellt.

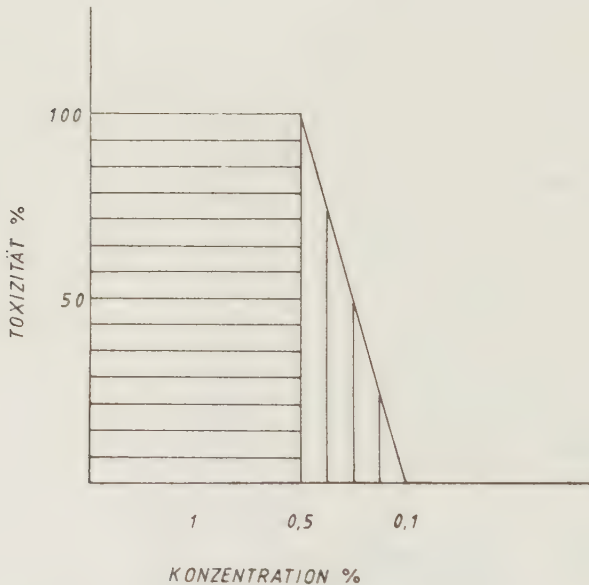


Abb. 10 Bereich der Zelltoxizität für
Natriumthiosulfat

Natriumsulfit

Eine 1 % Natriumsulfitkonzentration hatte eine totale Ablösung der Kulturzellen zur Folge. Der Umfang der Ablösung nahm mit sinkenden Konzentrationen ab, was wiederum eine zunehmende Zelldichte bedeutete. Der nichttoxische Bereich begann bei 0,05 %. Der pH-Wert des Kulturmediums verringerte sich von anfangs 8,1 auf zuletzt 7,2. In der Abbildung 11 sind die Ergebnisse dargestellt.

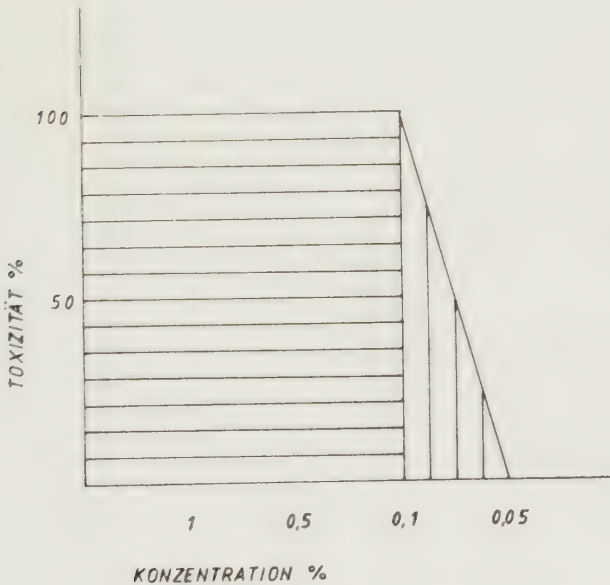


Abb. 11 Bereich der Zelltoxizität für Natriumsulfit

Natriumthioglycolat

Die absolute toxische Zone von Natriumthioglycolat reichte bis zu einer Konzentration von einschließlich 0,5 %. Die Cytotoxizität äußerte sich in Form einer partiellen Ablösung der Zellen, sowohl bei 1 % als auch bei 0,5 %. Ab 0,1 % ließ sich kein toxischer Einfluß von Natriumthioglycolat mehr feststellen. Der pH-Wert des Mediums betrug einheitlich 7,0 (vergleiche Abbildung 12).

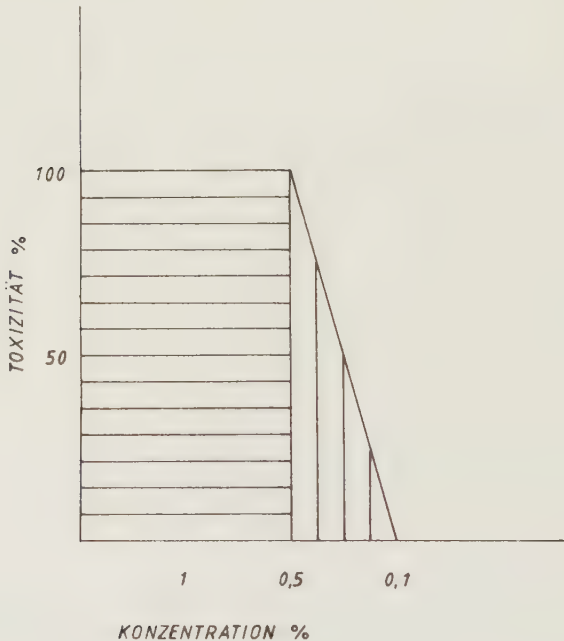


Abb. 12 Bereich der Zelltoxizität für
Natriumthioglycolat

Histidin

Histidin hatte bei keiner der geprüften Konzentrationen ab 1 % einen CTE zur Folge. Es mußte, um in Lösung gebracht zu werden, eine 1/2 Stunde bei 56°C im Wasserbad erwärmt werden. Der pH-Wert des Kulturmediums befand sich im neutralen Bereich (7,0).

3.2.3. Versuche zur Reduzierung der Cytotoxizität von Desinfektionswirkstoffen mit chemischen Neutrali- sierungsmittel

Die keimtötende (bakterizide, fungizide, viruzide) Wirkung der Desinfektionswirkstoffe wie auch weiterer chemischer, zur Virusinaktivierung verwendeter Substanzen läßt sich durch geeignete Neutralisierungsmittel ganz oder teilweise aufheben. Diese Möglichkeit ist schon seit langem bekannt. Erprobte Neutralisierungsmittel verwendet man für bekannte Wirkstoffe, um z. B. bei der Herstellung von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern die Wirkung des Inaktivierungsmittels zu stoppen oder um bei der Desinfektionsmittelprüfung nach Ablauf einer definierten Einwirkungszeit denselben Effekt zu bewirken. Entsprechende Anwendungsempfehlungen für Neutralisierungsmittel (Enthemmer) sind auch in den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft für Desinfektionsmittelprüfungen aufgeführt.

Ob eine Reihe bewährter Neutralisierungsmittel in bestimmter Konzentration geeignet ist, parallel zur mikrobiziden Wirkung auch die Cytotoxizität für kultivierte Zellen zu reduzieren oder gar weitgehend zu beseitigen, wurde am Modell von fünf repräsentativen, verschiedenartigen desinfizierenden Wirkstoffen, und zwar Formalin, Phenol, Jodophor, Chloramin T und Cetylpyridiniumchlorid, erstmals untersucht. Für die Tests kamen bewährte und von REYBROUCK (1978 und 1979) nach eingehender Prüfung empfohlene Neutralisierungsmittel zur Auswahl. Sie sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Die Konzentrationen für Wirkstoffe und Neutralisierungsmittel wurden den Ergebnissen der vorangegangenen Cytotoxizitätsprüfungen angepaßt (vergl. Abschnitte 3.2.1. und 3.2.2.). Verwendung fanden bei beiden Komponenten jeweils die zwei

letzten für Vero-Kulturzellen gerade noch toxischen Konzentrationen und die erste nicht mehr toxische Verdünnungsstufe. Für Jodophor in Kombination mit dem Neutralisiermittel Tween 80 waren es beispielsweise die cytotoxischen Jodophor-Konzentrationen 0,5 % und 0,1 % im Zellkulturmedium sowie als nicht-toxische Dosis 0,05 %, für Tween 80 die Konzentrationen 0,5 % und 0,1 % (cytotoxisch) und 0,05 % als nicht mehr toxisch.

Gemische aus Wirkstoffverdünnung und Neutralisiermittelverdünnung wurden im Kulturmedium angesetzt und á 2 ml auf Röhrchenkulturen anstatt Kulturmedium eingefüllt. Die Kombinationen aus Desinfektionswirkstoff und Neutralisiermittel und die variierenden Konzentrationen sind in der Tabelle 1 zu entnehmen. Jede aufgeführte Wirkstoffverdünnung wurde mit jeder Verdünnungsstufe aller aufgeführten Neutralisiermittel kombiniert.

Insgesamt geprüft als Neutralisiergemische wurden bei Formalin 9 Kombinationen, bei Phenol 27, bei Jodophor 45, bei Chloramin T 18 und bei Cetylpyridiniumchlorid 18. Mit keinem der Neutralisiergemische ließ sich für einen der fünf Wirkstoffe die Cytotoxizität für Vero-Zellen herabsetzen. Alle Versuche verliefen diesbezüglich negativ. Die cytotoxischen Grenzkonzentrationen der Wirkstoffe blieben unverändert.

Dieses Ergebnis ließ keinen Zweifel, daß viele der geprüften Neutralisiermittel zwar die mikrobizide Aktivität der Wirkstoffe begrenzen bzw. aufheben, in den geeigneten nichttoxischen Konzentrationen jedoch die Cytotoxizität nicht zu beeinflussen vermochten.

Tabelle 1: Schema der Desinfektionswirkstoffe mit den geprüften Konzentrationen und den jeweils damit kombinierten drei Neutralisierermittel-Konzentrationen (x)

Desinfektions- wirkstoffe und Konzentrationen (%)	Neutralisier- mittel	Konzentrationen in %						
		1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001
Formalin 0,05-0,01-0,005	Natriumthio- sulfat	x	x	x				
Phenol 0,1-0,05-0,01	Lecithin					x	x	x
	Tween 80		x	x	x			
	Natriumsulfit			x	x	x		
Jodophor 0,5-0,1-0,05	Tween 80		x	x	x			
	L-Cystin		x	x	x			
	Natriumsulfit			x	x	x		
	Natriumthio- glycolat	x	x	x				
	Natriumthio- sulfat	x	x	x				
Chloramin T 0,1-0,05-0,01	Natriumthio- glycolat	x	x	x				
	Natriumthio- sulfat	x	x	x				
Cetylpyridini- umchlorid 0,001-0,0005- 0,0001	Lecithin					x	x	x
	Natriumsulfit			x	x	x		

3.2.4. Versuche zur Enttoxifizierung von Reaktionsgemischen aus Virussuspension und Desinfektionsmittel durch Gelzentrifugation

3.2.4.1. Gel-Zentrifugiersystem mit Sephadex LH 20

Die Eignung der Gelzentrifugation zur Abtrennung von Viren aus mit cytotoxischen Wirkstoffen versetzten Suspensionen wurde mit einer in Anlehnung an BLACKWELL und CHEN (1970) gewählten Methode erprobt.

Der Aufbau des Gel-Zentrifugiersystems, welches in allen Versuchen eingesetzt wurde, ist in der Abbildung 13 im Grundriß dargestellt.

Ein Kunststoffröhrchen (Innenröhrchen) mit Rundboden und oberem Bördelrand, Durchmesser 2,4 cm, Länge 9 cm und Fassungsvermögen 30 ml, wird mit einer Gelsuspension bis etwa 3 cm unter den oberen Rand gefüllt. Zentral in den Boden des Röhrchens ist ein Loch von 0,5 mm Durchmesser gebohrt, dem ein Wattepfropf aufsetzt. Dieses Innenröhrchen wird in ein Außenröhrchen (Kunststoff, Spitzboden) von 2,7 cm Durchmesser und 12 cm Gesamtlänge, Fassungsvermögen 50 ml, gesteckt und durch einen dicht sitzenden Befestigungsring aus Kunststoff gehalten.

Das Röhrchensystem wird zuerst ohne Gelfüllung sterilisiert, dann eine 22 %ige Suspension von Sephadex LH 20 in PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach DULBECCO) eingefüllt und etwa 3 bis 4 Stunden bei Zimmertemperatur zum Quellen des Gels stehengelassen. Anschließend wird das System 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, wodurch aus dem Innenröhrchen überschüssiges PBS aus dem Gel tritt und aus dem Spitzboden des Außenröhrchens entfernt werden kann. Die Vorbereitung des Röhrchensystems ist damit abgeschlossen; es kann bis zum Gebrauch mit steriler Folie verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Beim Zentrifugierversuch läßt sich das Gel im Innenröhrchen mit 5 ml Zentrifugiergut (Reaktionsgemisch) überschichten. Wird anschließend in der Zentrifuge ein Schwerefeld von etwa 1000 g angelegt, soll Virus (großes Molekulargewicht) in PBS oder anderen Medien suspendiert, das

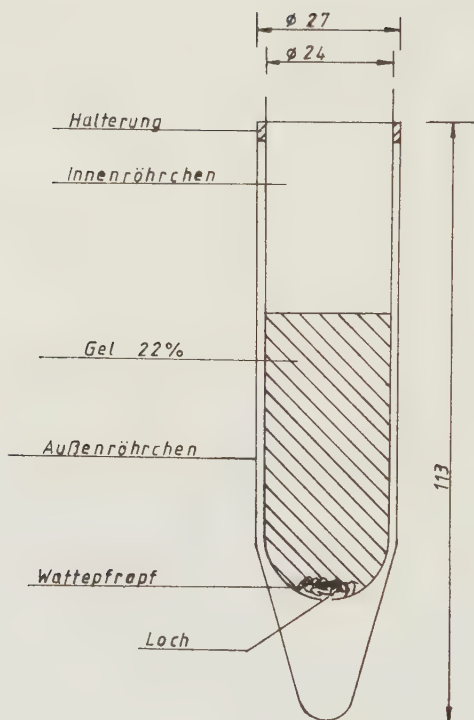


Abb. 13 Schema des Gelzentrifugiersystems mit Sephadex LH 20
(Maße in mm)

Gel nahezu ungehindert durchwandern und im Eluat gewonnen werden, das sich in der Spitze des Außenröhrchens ansammelt. Dagegen soll der (niedermolekulare) chemische Wirkstoff aus dem Reaktionsgemisch durch das Gel mit seinen hydrophilen Polysaccharidketten während der Zentrifugierphase zurückgehalten und so vom Virus getrennt werden.

Das im Zentrifugiersystem benutzte Gel läßt sich nach Desinfektion und gründlichem Auswaschen mit PBS ein oder zwei weitere Male wiederverwenden, bevor es mit erneuertem Sephadex LH 20 frisch vorbereitet werden muß.

3.2.4.2. Gelzentrifugation von Virus

Die Grundvoraussetzung für die uneingeschränkte oder bedingte Eignung des Gel-Zentrifugiersystems war, daß überschichtetes Virus möglichst in seiner Gesamtmenge und ohne wesentliche Verluste in einer angemessenen Zentrifugierzeit das Gel passiert und im Eluat gewonnen, bzw. nachgewiesen werden kann.

In einem Vorversuch wurde zunächst geprüft, ob und in welcher Zeit ein Virus die Gelsäule weitgehend durchwandert. Gelröhrchen wurden dazu mit je 5 ml einer konzentrierten Kulturvirus suspension von Poliomyelitisvirus überschichtet, als Farbmarkierung 1 ml Phenolrotlösung zugegeben, nach jeweils 3, 5, 7 und 10 Minuten Zentrifugierzeit bei 1000 g die Menge des Eluats im Außenröhrchen gemessen und der Virusgehalt bestimmt.

Nach 3-minütiger Zentrifugation waren etwa 1 ml und nach 5 Minuten im Mittel 3,6 bis 3,8 ml im Eluat versammelt, nach 7 bis 10 Minuten nahm das eluierte Volumen nur noch um 0,25 bis 0,1 ml zu, so daß nach 10 Minuten im Durchschnitt insgesamt etwa 4,5 ml zurückgewonnen werden konnten. Virus ent-

hielten alle Phasen mit dem Virushauptanteil nach 5 und mehr Minuten Zentrifugation. Der Farbindikator lag in dieser Zeit in einer 3 cm breiten Zone im Gel, das Eluat blieb immer farblos.

Mit dem kleinen unbehüllten Poliomyelitisvirus und dem relativ großen behüllten Pseudowutvirus wurden im anschließenden Versuch die quantitativen Verhältnisse der Passage und Rückgewinnung dieser beiden Viren aus dem Eluat festgestellt. Als einheitliche Zentrifugierzeit für 5 ml überschichtetes Virus wurden 7 Minuten eingehalten, d.h. der Virusgehalt des 7-Minuten-Eluats galt als Vergleichsbasis zu überschichteten Ausgangsvirus. Die Ergebnisse der Einzelversuche, jeweils doppelt angesetzt, sind in der Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Virusgehalt in Suspensionen von Polio- und Pseudowutvirus vor und nach Gelzentrifugation (7 min) durch Sephadex LH 20; Durchschnittswerte aus 2 Versuchen

Fraktion	Virusgehalt, KID ₅₀ /ml	
	Poliovirus	Pseudowutvirus
Überschichtete Virussuspension (5 ml) vor Gelzentrifugation	$10^{7,5}$	$10^{7,0}$
7 min-Eluat (4,5 ml) nach Gelzentrifugation	$10^{6,5}$	$10^{6,75}$

Diese Prüfung verlief nur teilweise zufriedenstellend. Das große Pseudowutvirus passierte das Gel ohne signifikante Verluste. Die Differenz im Virusgehalt zwischen Ausgangssuspension und eluiertem Virus liegt im Fehlerbereich der Meßmethode.

Beim Poliomyelitisvirus dagegen resultierte ein Unterschied von einer Zehnerpotenz, was einem Schwund an überschichtetem Virus von 90 % gleichkäme. Die Signifikanzgrenze der Abweichung errechnet sich bei der verwendeten Methode der Virusgehaltsbestimmung mit $0,9 \log 10$.

3.2.4.3. Reduzierung der Cytotoxizität

In diesem Abschnitt galt es zu untersuchen, ob und wie weit sich die Cytotoxizität der in den bisherigen Untersuchungen verwendeten Desinfektionswirkstoffe Formalin, Phenol, Jodophor, Chloramin T und Cetylpyridiniumchlorid mit Hilfe der Gelzentrifugation reduzieren läßt. Dazu wurden von jedem der Wirkstoffe, beginnend bei einer 10 %igen Lösung, Verdünnungen hergestellt (vergl. Tabelle 3). Nach Überschichtung je einer Gelsäule mit 5 ml der verschiedenen Wirkstoffverdünnungsstufen wurde 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und die Eluate auf je 4 Vero-Kulturröhrchen verimpft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Die Prüfungen ergaben ein gänzlich unterschiedliches Bild. Formalin und das stark cytotoxische Cetylpyridiniumchlorid wurden durch das Sephadex-Gel nicht zurückgehalten und wanderten unverdünnt während der Zentrifugierzeit durch das Gel. Die Cytotoxizität im Eluat blieb gegenüber den in Abschnitt 3.2.1. ermittelten Werten gleich stark, eine Verschiebung der Grenze ließ sich auch im Eluat der zentrifugierten Grenzverdünnungen dieser Mittel nicht feststellen.

Sehr gut wurde die Cytotoxizität von Phenol, Jodophor und Chloramin T durch das Gel abgetrennt. Für alle 3 Mittel ließ sich die Cytotoxizität um das mindestens Zweihundertfache reduzieren.

3.2.4.4. Eignung für den Restvirusnachweis

In Reaktionsgemischen zwischen Virus und Wirkstoff wird unter bestimmten Reaktionsbedingungen nicht alles vorgegebene Virus inaktiviert; eine Restvirusmenge verbleibt im infektiösen (vermehrungsfähigen) Zustand. Eine gute Methode der Enttoxifizierung von Virus-Wirkstoffgemischen sollte gewährleisten, daß die nicht inaktivierte Restvirusmenge nach der Behandlung quantitativ vollständig nachgewiesen werden kann.

Im Versuchsansatz wurden Suspensionen von Poliomyelitisvirus und Pseudowutvirus mit unterschiedlichen, zur vollen und partiellen Inaktivierung geeigneten Konzentrationen von Chlorbleichlauge (Natriumhypochlorit) 15 Minuten bei Raumtemperatur vorbehandelt (Konzentrationen vergl. Tabelle 4), anschließend sofort der Gelzentrifugation unterzogen und die Eluate auf Restvirusgehalt untersucht. Als Kontrollen dienten die jeweils gleichen Reaktionsgemische; sie wurden jedoch direkt auf das Zellkultur-Virusnachweissystem in Verdünnungen verimpft. Die Chlorbleichlauge wurde deshalb ausgewählt, weil die Cytotoxizität dieses Mittels bei sehr guter Viruzidie gegenüber beiden Testvirusarten in den geringen Anwendungskonzentrationen im Rahmen dieses Vergleiches nicht ins Gewicht fiel.

In den Tabellen 4 und 5 sind die Ergebnisse dieser Prüfungen zusammengestellt.

Die Chlorbleichlauge wirkt bei beiden Viren sehr gut und rasch viruzid, ihre Wirkung nimmt nach 5 Minuten Einwirkung nur mehr geringfügig zu. Nach 15 Minuten Inkubation läuft die Inaktivierung des Virus kaum noch weiter. Aus diesem Grunde war zu erwarten, daß während einer anschließenden Gelzentrifugation, bei der das Restvirus vom Inaktivierungsmittel nur langsam abgetrennt wird, keine signifikante weitere Inaktivierung erfolgte und im Vergleich zu der nicht gelzentrifugierten Kontrolle ins Gewicht fällt.

Beim Poliovirus bestätigte sich der durch die Gelzentrifugation bedingte Virusverlust, wie er bereits in Abschnitt 3.2.4.2. nachgewiesen werden konnte. Er betrug bei der Anwendung schwacher Chlorbleichlauge-Konzentrationen, die keinen viruziden Effekt mehr bewirkten, wiederum jeweils eine Zehnerpotenz. Restvirus nach Behandlung mit 0,3 %iger Chlorbleichlauge wurde durch die Gelzentrifugation deutlich und fast in signifikanter Menge dezimiert, bei Zusatz von 1 % Chlorbleichlauge, wo eine kritische Restvirusmenge von etwa 30 infektiösen Einheiten pro ml verblieb, war der Verlust gravierend und senkte die entscheidende Nachweisgrenze für Restvirus. Das Gel-Zentrifugiersystem scheint deshalb zum Nachweis sehr kleiner Restvirusmengen bei diesem und ähnlich kleinen unbehüllten Viren als nicht bzw. nur bedingt geeignet.

Wiederum aber befriedigte der Restvirusnachweis im Anschluß an die Gelzentrifugierung von Pseudowutvirus. Signifikante Virusverluste traten nicht auf. Auch nach Inaktivierung mit der stärksten Chlorbleichlauge-Konzentration ließ sich nach der Zentrifugation im Eluat nicht signifikant weniger Restvirus feststellen.

Tabelle 4: Restvirusgehalt von Reaktionsgemischen aus Poliovirus und vier Chlorbleichlauge-Konzentrationen vor und nach Gelzentrifugation

Konzentration in % der Chlorbleichlauge	Virusgehalt in KID ₅₀ /ml	
	im Reaktionsgemisch nach Inkubation	im Eluat nach Inkubation und Gel- zentrifugation
1 %	$10^{1,5}$	$<10^{0,5}$
0,3 %	$10^{2,75}$	$10^{2,0}$
0,1 %	$10^{6,5}$	$10^{5,5}$
0,01 %	$10^{6,5}$	$10^{5,5}$

Tabelle 5: Restvirusgehalt von Reaktionsgemischen aus Pseudowutvirus und vier Chlorbleichlauge-Konzentrationen ohne und nach Gelzentrifugation

Konzentration in % der Chlorbleichlauge	Virusgehalt in KID ₅₀ /ml	
	im Reaktionsgemisch nach Inkubation	im Eluat nach Inkubation und Gel- zentrifugation
0,2	$10^{1,5}$	$10^{1,0}$
0,1	$10^{3,0}$	$10^{2,75}$
0,02	$10^{5,5}$	$10^{5,5}$
0,002	$10^{5,25}$	$10^{5,5}$

4. Besprechung der Ergebnisse

In der Prüfung von 5 Desinfektionswirkstoffen an Kulturzellen der Affennieren (Vero)-Zelllinie bestätigte sich deren relativ starke Cytotoxizität. Vier Verbindungen - Formalin, Phenol, Jodophor und Chloramin T - wirkten noch toxisch, wenn sie im Erhaltungsmedium der Zellkulturen in der Konzentration von etwa 0,05 % vorlagen. In Handelsdesinfektionsmitteln, die überwiegend als Konzentrat angeboten werden, sind die Wirkstoffe nicht 100 %ig vertreten. Sie werden in 1-2 %iger Lösung angewendet. In der Gebrauchs-Desinfektionslösung ist der Wirkstoff dann etwa mit Anteilen von 0,5 bis 1 % enthalten. Reaktionsgemische aus Virus und Desinfektionsmittel mit solchem Wirkstoffgehalt kann man wegen ihrer Cytotoxizität nachweislich nicht auf Zellsysteme verbringen, um eventuell nicht-inaktiviertes Virus zu isolieren, selbst wenn sie üblicherweise nur im Verhältnis 1:10 dem Zellkulturmedium zugesetzt werden, was einer weiteren Verdünnung auf etwa 0,05 bis 0,1 % entspricht. Die eigenen Ergebnisse dieser Prüfungen stimmen mit den bisherigen Erfahrungen, daß Reaktionsgemische mit 1-2 % Desinfektionsmittelanteil in der Regel vor der Prüfung auf Restvirus an Zellkulturen im Verhältnis 1:100 (10^{-2}) verdünnt werden müssen, um nicht mehr cytotoxisch zu wirken (DREES, 1956; MAHNEL, 1974), gut überein. Sie bestätigen auch die Kalkulationen über cytotoxische Grenzkonzentrationen, die allerdings nur anhand von Prüfungsberichten des Schrifttums für Formalin (MAHNEL und HERLYN, 1976; TANABE und HOTTA, 1976; SHEN und Mitarbeiter, 1977), Chloramin T und Phenol (BLACKWELL und CHEN, 1970; MAHNEL und HERLYN, 1976), möglich waren.

Die Größenordnung für die Cytotoxizität dieser Wirkstoffe gilt auch für andere Arten von Kulturzellen z. B. für HEP₂-Zellen und 0,05 % Grenzttoxizität bei Phenol (BLACKWELL und CHEN, 1970), wobei zu berücksichtigen ist, daß primär und

sekundär kultivierte Vertebratenzellen sich überwiegend empfindlicher verhalten als permanente Zelllinien.

Etwa hundertfach stärker cytotoxisch wirkte die quaternäre Ammoniumverbindung Cetylpyridiniumchlorid. Dabei sei bemerkt, daß oberflächenaktive Verbindungen in Desinfektionsmitteln bzw. -Konzentraten meist mit nur kleinem Anteil von wenigen Prozent vertreten sind.

Als cytotoxisch für Vero-Kulturzellen erwiesen sich auch sieben von acht geprüften Neutralisiermitteln, sog. Enthemmern, über die diesbezügliche Daten noch fehlten. Von ihnen sind Natriumthiosulfat und Natriumthioglycolat als relativ schwach cytotoxisch einzustufen, mit Grenzkonzentrationen im Kulturmedium von etwa 0,1 bis 0,3 %. Eine Guppe mit Tween 80, L-Cystein und Natriumsulfit wirkte etwas stärker bis zu Konzentrationen von etwa 0,05 %, Lubrol sowie auch Lecithin stark cytotoxisch ähnlich Desinfektionswirkstoffen. Nur Histidin zeigte in 1 % Konzentration im Kulturmedium keine derartige Wirkung. Dieses Ergebnis ließ befürchten, daß der Zusatz gebräuchlicher Neutralisiermitteln bei Desinfektionsmittelprüfungen auf Viruzidie wenig von Wert sein dürfte, weil diese Verbindungen selbst in geeigneten, neutralisierend wirksamen Konzentrationen cytotoxisch sind und so wie Desinfektionsmittel den Virusnachweis in Zellkulturen stören bzw. verhindern.

Solche Überlegungen erübrigten sich durch die Erkenntnisse aus den eigenen darauffolgenden Versuchen. Die Neutralisiermittel waren in geeigneten Konzentrationen nicht in der Lage, die Cytotoxizität der 5 einbezogenen Desinfektionswirkstoffe auch nur geringfügig zu reduzieren. Die mikrobiziden Effekte, die neutralisierbar sind, dürften deshalb unterschiedlich sein zu den Mechanismen der Cytotoxizität eines Desinfektionswirkstoffes. Neutralisiermittel bzw. Enthemmer sind aufgrund

der Ergebnisse weitgehend ungeeignet für eine Reduzierung oder Bewertung der Cytotoxizität von Desinfektionsmitteln für Kulturzellen.

Als praktikables physikalisches Verfahren für eine Eliminierung der Cytotoxizität (Enttoxifizierung) von Reaktionsgemischen aus Virus und Desinfektionsmitteln bot sich aus dem vorliegenden experimentellen Schrifttum allein die von BLACKWELL und CHEN (1970) erstmals erprobte Gelzentrifugation an. Über diese Methode lagen zwar keine genauen Analysen vor, immerhin wurde diese Technik in einigen einschlägigen Arbeiten von BLACKWELL und Mitarbeitern (1975), MATISHEK (1978), SCOTT (1980) und BROWN (1981) weiter verwendet, ohne daß über gravierende Mängel oder andere negative Aspekte berichtet wurde. Es war naheliegend, diese Technik aufzugreifen und ihre Brauchbarkeit nicht nur hinsichtlich der Eliminierung der Cytotoxizität, sondern auch bezüglich der virologischen Signifikanz zu prüfen. Verwendet wurde - im Interesse der Vergleichbarkeit - wie bei den Vorbenutzern Sephadex LH 20, jedoch in einer leicht modifizierten Gel-Zentrifugationstechnik, die auf rasches Arbeiten und Probenvolumen von 1 bis 5 ml abgestimmt ist.

Die Gelzentrifugation erwies sich auch in den eigenen Versuchen als relativ einfach und praktisch für die Aufbereitung von Reaktionsgemischen aus Virus und Desinfektionsmitteln vor dem Restvirusnachweis in Zellkulturen. Die erzielten Ergebnisse weisen jedoch auf einige Mängel dieses Verfahrens hin, die nicht bekannt, von den Vorbenutzern nicht erwähnt oder auch geprüft worden waren und welche die praktische Anwendung des Verfahrens einschneidend begrenzen dürfte. Die Einschränkung gilt zunächst für Virusverluste, die allein durch die Gelzentrifugation bedingt sind. Beim kleinen kompakten Polio-myelitisvirus waren sie signifikant und lagen bei etwa 90 %. Dieser wesentliche Fehler wurde nach einer Gelzentrifugierung

von konzentrierten Virussuspensionen wie auch bei Proben mit sehr geringem Virusgehalt nachgewiesen. Keine Verluste im Virusgehalt traten dagegen beim relativ großen Pseudowutvirus aus der Herpesvirusgruppe auf. Soll die Gelzentrifugation im Rahmen von Desinfektionsmittelprüfungen zur Enttoxifizierung eingesetzt werden, ist es deshalb notwendig, vorab an den einzelnen einbezogenen Testviren zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß mit Verlusten zu rechnen ist. Zumindest bei kleinen hüllenlosen Viren scheint dies der Fall zu sein. Ergebnisse solcher Prüfungen mit anderen Viren liegen leider nicht vor, weitere Vergleiche sind somit nicht möglich. BLACKWELL und CHEN haben in ihrer Erstbeschreibung dieser Technik nur vermerkt, daß sie beim alleinig eingesetzten Herpes simplex-Virus geringe Verluste, am Rande der Signifikanz und von weniger als einer Zehnerpotenz, in Kauf nehmen mußten.

Nicht befriedigend und gegenüber den wenigen Bemerkungen der Vorbenutzer der Methode z.T. deutlich differierend verliefen die eigenen Versuche über die Eliminierbarkeit der Toxizität bei den 5 ausgewählten Desinfektionswirkstoffen durch Gelzentrifugation. Ausgezeichnet ließ sich die Cytotoxizität für Kulturzellen von Phenol, dem verwendeten Jodophorpräparat und von Chloramin T aus den Reaktionsgemischen bei bis zu 10 % Wirkstoffkonzentration entfernen. Auf der anderen Seite hatte das Gel im Rahmen des angewandten Verfahrens bei Formalin und der von uns gewählten quaternären Ammoniumverbindung Cetylpyridiniumchlorid keine reduzierende Wirkung auf die Cytotoxizität. Diese Feststellung überraschte außerordentlich. Übereinstimmend mit BLACKWELL und CHEN (1970) erwies sich die gute Detoxifizierbarkeit für Phenol und das Chlorpräparat. Im eigenen Versuch ließ sich auch die Cytotoxizität von Jodophor selbst bei einer Konzentration von 10 % entfernen bzw. um das etwa 200-fache reduzieren. Bei der von BLACKWELL und CHEN verwendeten Jodophorverbindung gelang die Detoxifizierung etwa 100-fach. Bei einer quaternären Ammoniumverbindung er-

zielten die Autoren zumindest eine Reduktion der cytotoxischen Grenze um das 5- bis 10-fache, das im eigenen Versuch geprüfte Cetylpyridiniumchlorid passierte das Gel unvermindert. Auffallend differeierten die Ergebnisse gegenüber BLACKWELL und CHEN und anderen Benutzern der Gelzentrifugation bei Formalin. Erstere vermerken eine weitreichende Eignung (bis 8 %) auch bei diesem viel eingesetzten Wirkstoff, die anderen nennen jedenfalls keine Fehlergebnisse. In den eigenen Testen dagegen mißlang die Eliminierung des Formalins in jeglicher Konzentration aus den Reaktionsgemischen.

Aus der Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse zu den wenigen Angaben im Schrifttum ist somit festzuhalten, daß die Enttoxifizierung von Desinfektionsmittel-haltigen Reaktionsgemischen mittels Gelzentrifugierung in vielen Bereichen geeignet, aber nicht uneingeschränkt möglich ist. Sie muß für jeden Wirkstoff mit der angewandten Technik eigens überprüft werden, entsprechende Kontrollversuche sind immer erforderlich und bei einer Reihe von Virusarten müssen Verluste, damit eine Anhebung der Grenze der Nachweisbarkeit in Kauf genommen werden. Obwohl sich die Gelzentrifugierung - neben der weltweit geübten, zum Nachweis geringerer Restvirusmengen aber ungeeigneten Ausverdünnungsmethode - als physikalisches Verfahren für den Einsatz bei Desinfektionsmittelprüfungen an Viren empfiehlt, stellt sie nur eine bedingt geeignete Methode dar.

5. Zusammenfassung

Fünf Desinfektionswirkstoffe, Formalin, Phenol, Jodophor, Chloramin T und Cetylpyridiniumchlorid, wurden auf ihre cytotoxische Wirkung geprüft, die sie nach Zugabe ins Kulturmedium auf Affennierenzellen der Vero-Zelllinie entfalten. Mit Ausnahme der quaternären Ammoniumverbindung, deren Cytotoxizität hundertfach größer war, verhielten sich die chemischen Wirkstoffe etwa gleich stark cytotoxisch. Auch acht chemische Neutralisiermittel, die bei der Desinfektionsmittelprüfung zur Neutralisierung der mikrobiziden Wirkung verwendet und auch als Enthemmer bezeichnet werden, erwiesen sich mit einer Ausnahme als mehr oder weniger cytotoxisch.

Versuche, die Cytotoxizität der fünf Desinfizientien für Kulturzellen durch geprüfte Neutralisiermittel in geeigneter Verdünnung zu reduzieren, verliefen erfolglos. In keinem Falle konnte eine enttoxifizierende Wirkung nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer in den letzten Jahren eingesetzten Methode der Gelzentrifugation, bei der Reaktionsgemische aus Virus und Desinfektionsmittel über die Zentrifugierung durch ein Sephadex-Gel enttoxifiziert werden und die in modifizierter Form herangezogen wurde, gelang es, Reaktionsgemische mit Phenol, Jodophor und Chloramin T sehr gründlich zu enttoxifizieren. Bei Formalin und Cetylpyridiniumchlorid blieb dieses Verfahren dagegen ohne Wirkung. Mit der Gel-Zentrifugation von Gemischen mit Poliomyelitisvirus waren signifikante Virusverluste von etwa 90 % verbunden, dagegen passierte das Pseudowutvirus das Gel ohne signifikante Reduktion der Virusmenge.

Auch die Gelzentrifugation wird deshalb als nur bedingt geeignet zur Detoxifizierung von Virus-Desinfektionsmittelgemischen gehalten.

Tests to eliminate toxicity of cell cultures of reacting compounds of virus and disinfectants.

Summary

The cytotoxic efficacy of formaline, phenol, iodophor, chloramine T und cetylpyridiniumchloride was tested by adding them to the monkey kidney-cell mediums (vero-cell-linie). All the chemical agents had about the same cytotoxicity except the quaternary ammonium compound, whose cytotoxicity was one hundred times higher. Eight chemical inactivators, which were used to neutralize the germicidal effects, were also found to be more or less cytotoxic with one exception.

Tests to reduce the cytotoxicity of the five disinfectants for culture cells by proved chemical inactivators in appropriate dilutions were unsuccessful. Neutralizing activity was demonstrated (found) in none of the cases. By using a modified method of "Sephadex-Gel" centrifugation, through which reaction-compounds of viruses and disinfectants are detoxified, it was possible to effectively detoxify the reaction-compounds of phenol, iodophor, chloramine T. However this method had no effect on formaline and cetylpyridiniumchloride. The gel centrifugation of poliomyelitis virus was associated with significant virus loss of about 90 %, whereas the centrifugation of pseudorabies resulted in no significant reduction of the viral content. It passed the gel without a significant reduction of the virus content.

Therefore, the suitability of gel centrifugation in the detoxification of virus-disinfectant compounds is limited.

6. Literaturverzeichnis

- BINGEL, K.F. und C. HERMANN, 1966: Die experimentelle Desinfektion des Vakziniavirus als Grundlage für die klinische Pockendesinfektion.
Die medizinische Welt 17, 76-82.
- BLACKWELL, J.H., and J.H.S. CHEN, 1970: Effects of Various Germicidal Chemicals on H.Ep. 2 Cell Culture and Herpes Simplex Virus.
J. Assoc. Analytical Chem. 53, 1229-1236.
- BLACKWELL, J.H., J.H. GRAVES, and P.D. MCKERCHER, 1975: Chemical Inaktivierung von Swine Vesicular Diseases Virus.
Brit. Vet. J. 131, 317-323.
- BROWN, T.T., 1980: Laboratory Evaluation of Selected Disinfektanten als Virucidal Agents Against Porcine Parvovirus, Pseudorabies Virus, and Transmissible Gastroenteritis Virus.
Amer. J. Vet. Res. 42, 1033-1036.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE, 1972: Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. 3. ergänzte Auflage.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V., 1977: Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin.

- DEUTSCHE VEREINIGUNG ZUR BEKÄMPFUNG DER VIRUSKRANKHEITEN,
1982: Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der
Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrank-
heiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln
auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 25, 397-398;
mit Kommentar dazu Bundesgesundheitsblatt 26, 413-415.
- DREES, O., 1956: Experimentelle Beiträge zur Desinfektions-
mittelprüfung bei Poliomyelitis.
Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. 166, 528-545.
- EGGENSBERGER, H., 1973: Desinfektionswirkstoffe und ihre
Wirkungsmechanismen.
Dtsch. Apotheker-Zeitung 1973, 785-791.
- HORN, H., M. PRIVORA und W. WEUFFEN, 1972: Handbuch der
Desinfektion und Sterilisation, Band I: Grundlagen
der Desinfektion.
VEB-Verlag Volk und Gesundheit Berlin, 1972, S. 146,
154, 173, 309.
- KIRCHHOFF, H., 1969: Probleme der Virusdesinfektion am
praktischen Beispiel des Newcastle Disease Virus.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 76, 71-74.
- LIESS, B. und E. SCHURIAN, 1973: Inaktivierende Wirkung von
TEGO 51/15 DL im Suspensionsversuch mit zwei Virus-
arten der Toga-Gruppe: der Europäischen Schweinepest
und der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease.
Arch. Lebensmittelhyg. 24, 154-157.

- MAHNEL, H., 1974: Viruzide Wirkung von Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 87, 385-388.
- MAHNEL, H., 1983: Desinfektion von Viren.
Zbl. Vet. Med. B, 30, 81-96.
- MAHNEL, H. und H. HERLYN, 1976: Stabilität von Teschen-, HCC-, ND- und Vacciniavirus gegenüber 5 Desinfektionswirkstoffen.
Zbl. Vet. Med. B, 23, 403-411.
- MATHEKA, H.D. und G. WITTMANN, 1961: Das Entsalzen von Virus-suspensionen durch Gel-Filtration.
Zbl. Bakt. Hyg., I Orig. 182, 169-178.
- MATISHECK, P., 1978: In Vitro Activity of Chlorhexidine Diacetate Against Pseudrabies Virus.
Vet. Med. Small Animal Clinic. 73, 796-799.
- REYBROUCK, G., 1978: Bacterial Activity of 40 Potential Disinfectants Inactivators.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167, 528-534.
- REYBROUCK, G., 1979: Efficacy of Inactivators Against 14 Disinfectant Substances.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 168, 480-492.
- SCOTT, W.F., 1980: Virucidal Disinfectants and Feline Viruses.
Amer. J. Vet. Res. 41, 410-414.

- SHEN, D.T., T.B. CRAWFORD, J.R. GORHAM, and T.C. MCGUIRE,
1977: Inactivation of Equine Infectious Anemia Virus
by Chemical Disinfectants.
Amer. J. Vet. Res. 38, 1217-1219.
- SPORKENBACH, J., K.-J. WIEGERS und R. DERVICK, 1981: Die
virusinaktivierende Wirkung von Persäuren und per-
saurigen Desinfektionsmitteln.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 173, 425-439.
- TANABE, J., and S. HOTTA, 1976: Effects of Disinfectants on
Variola Virus in Cell Culture.
Appl. Environ. Microbiol. 32, 209-212.
- WALLHAÜSER, K.-H., 1978: Sterilisation-Desinfektion-
Konservierung.
2. Neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag
Stuttgart, 323.
- WRIGHT, S.H., 1974: Virucidal Activity of Commercial
Disinfectants Against Velogenic Viscerotropic Newcastle
Disease Virus.
Avian Diseases, 18, 526-530.
- ZUFFA, A. und A.R. NEURATH, 1961: Formaldehyd -Inaktivierung
von Pseudorabies (Aujeszky) Virus.
Arch. exp. Vet. Med. 16, 11-17.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr möchte
ich sehr herzlich für die Überlassung
eines Arbeitsplatzes danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn
Prof. Dr. H. Mahnel für die Überlassung
des Themas und für die jederzeit gern
gewährte Unterstützung und für wertvolle
Hinweise.

Lebenslauf

Am 31. Januar 1953 wurde ich, Michael Roesger, als Sohn des Tierarztes Dr. Wolfgang Roesger und seiner Ehefrau Ingeborg Roesger geb. Reinle in Freiburg im Breisgau geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Möhringen, von dort wechselte ich in das Gymnasium Tuttlingen. 1971 ging ich auf das Internat Gaienhofen, wo ich 1973 mein Abitur ablegte.

1975 begann ich eine zweijährige Ausbildung als veterinärmedizinisch-technischer Assistent. Nach Abschluß der Ausbildung arbeitete ich für kurze Zeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Im WS 1977 begann ich in München mit dem Studium der Tiermedizin und legte am 17.12.1982 das Staatsexamen ab.

Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 27. Januar 1983.

